



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 19 846 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 198 19 846.9
㉔ Anmeldetag: 5. 5. 98
㉕ Offenlegungstag: 11. 11. 99

⑤① Int. Cl.⁶:
C 07 K 16/00
A 61 K 39/395
C 12 N 15/63
// G01N 33/569,
33/574

DE 198 19 846 A 1

⑦① Anmelder:
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

⑦② Erfinder:
Little, Melvyn, 69151 Neckargemünd, DE;
Kipriyanov, Sergej, 69121 Heidelberg, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
WO 91 19 739
CA 119:157915a;
CA 126:130370a;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Multivalente Antikörper-Konstrukte

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F_V-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F_V-Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F_V-Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.

DE 198 19 846 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente F_V-Antikörper-Konstrukte, sie kodierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der F_V-Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei V_H- und zwei V_L-Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer V_H- und einer V_L-Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen die konstanten Domänen fehlen. Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch die variablen Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit F_V-Antikörper-Konstrukten bezeichnet. Diese liegen häufig in Form einzelkettiger, sich miteinander gepaarter Monomere vor.

Es hat sich allerdings gezeigt, daß F_V-Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische Zwecke einsetzbar macht.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes F_V-Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines F_V-Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimeres vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_V-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10–30 Aminosäuren aufweist. Des weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_V-Antikörper-Konstrukt mit anderen F_V-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d. h. multivalentes, F_V-Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das F_V-Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes F_V-Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck "F_V-Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

Der Ausdruck "multivalentes F_V-Antikörper-Konstrukt" weist auf einen F_V-Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Solches wird erreicht, wenn sich das einzelkettige F_V-Antikörper-Konstrukt

mit sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzelkettigen F_V-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. In letzterem Fall liegt ein F_V-Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das F_V-Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d. h. es ist bi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Ferner können die variablen Domänen gleich oder verschieden voneinander sein, wodurch das Antikörper-Konstrukt ein oder mehrere Antigene erkennt. Vorzugsweise erkennt das Antikörper-Konstrukt ein oder zwei Antigene, d. h. es ist mono- bzw. bispezifisch. Beispiele solcher Antigene sind die Proteine CD19 und CD3.

Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_V-Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 0–10 Aminosäuren aufweisen. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOH-Rest einer der variablen Domänen und dem NH₂-Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_V-Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3–10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_V-Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen F_V-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11–20 Aminosäuren, insbesondere 15–20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz (G₄S)₄, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_V-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

Ein erfindungsgemäßes F_V-Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_V-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1–5 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke "F_V-Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

DNAs, die für ein erfindungsgemäßes F_V-Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3 × 19-LL, pDISC3 × 19-SL, pPiC-DISC-LL und pPiC-DISC-SL. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

- (a) ein erfindungsgemäßes F_v-Antikörper-Konstrukt, und/oder
- (b) ein erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
- (c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt bereit, bei dem die variablen Domänen über Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu binden. Das erfindungsgemäße F_v-Antikörper-Konstrukt eignet sich daher bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden. Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tumor-Erkrankung, gesehen werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen F_v-Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His₆: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 2 zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3 × 19-LL und pDISC3 × 19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E1 erkannt wird; His₆: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatylase (PelB-Leader); rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 3 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3 × 19-LL. 6 × His: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β-Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (Gly₄Ser)₄-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatylase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 4 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3 × 19-SL. 6 × His: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für βpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid codiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatylase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 5 zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete

Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3 × 19-LL kodierten bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. c-myc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His₆-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatylase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 6 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3 × 19-SL kodierten tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. c-myc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region, Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His₆-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatylase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 7 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem Pichia-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des Saccharomyces cerevisiae-α-Faktor-Sekretionssignals; V_H: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 8 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das bivalente F_v-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem Pichia-Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des Saccharomyces cerevisiae-α-Faktor-Sekretionssignals; V_H: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Konstruktion der Plasmide pDISC3 × 19-LL und pDISC3 × 19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Bakterien

Die Plasmide pHOG-αCD19 und pHOG-dmOKT3, welche für die scFv-Fragmente codieren, die von dem Hybridom HD37, das für menschliches CD19 (Kipriyanov et al., 1996, J. Immunol. Meth. 196, 51–62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybridom OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov et al., 1997, Protein Eng. 10, 445–453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges F_v-Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der V_H-Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen GlyGly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP1, 5'-TCACACAGAATTCTTAGATCTATTAAAGAGGAGAAATTAACC, und DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTGGC, erzeugt (vgl. **Fig. 2**). Das PCR-Fragment 1 wurde mit EcoRI und EcoRV gespalten und mit dem mit EcoRI/EcoRV linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der V_L-Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für ein c-myc-Epitop und einen Hexahistidynschwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-AGCA-

CACAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAAAC-TCCA, und DP4, 5'-AGCACACTCTAGAGACACACAGATCTTTAGTGATGGTGATGTGAGTTTAG-G, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit HindIII und XbaI gespalten und mit dem durch HindIII/XbaI linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. Fig. 2). Das für das hybride scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19 wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG und entweder Li-1, 5'-TATA-TACTGCAGCTGCACCTGGCTACCACCAC-CACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCACCGCCGCC-AGAACCACCACCAGCGGCCGCAGCATCAGCC-CG, zur Erzeugung eines langen flexiblen (Gly₄Ser)₄-inter-scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. Fig. 2) oder Li-2, 5'-TATATACTGCAGCTGCACCTGGCGACCTGGGCCAC-CAGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines kurzen, starren GGPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. Fig. 2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3 × 19-LL und pDISC3 × 19-SL wurden durch Ligierung des NcoI/PvuII-Restriktionsfragments aus pHOG 19-3, umfassend das Vektorgerüst und die NcoI/PvuII-gespaltenen PCR-Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. Fig. 3, 4). Die vollständige Nukleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte sind in den Fig. 5 bzw. 6 angegeben.

Beispiel 2

Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Hefe

(A) Konstruktion von pPIC-DISC-SL

Der Vektor pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen in der Hefe *Pichia pastoris* wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Er enthält ein Gen, das für das *Saccharomyces cerevisiae* α-Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem dominanten selektierbaren Marker, ZeocinTM, der sowohl in *Pichia* als auch in *E. coli* bifunktionell ist. Das Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) codiert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3 × 19-SL unter Verwendung der Primer 5-PIC, 5'-CCGTGAATTCCAGGTGCAACTGCAG-CAGTCTGGGGCTGAACTGGC, und pSEXBN 5'-GGTTCGACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit EcoRI und XbaI gespalten und in mit EcoRI/XbaI linearisiertes pPICZαA ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequenzen des tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 7 gezeigt.

(B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der Grundlage von pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) und pDISC3 × 19-LL (vgl. Fig. 3) durchgeführt. Die Plasmid-DNA pPICZαA wurde mit EcoRI gespalten. Die überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die so erhaltene DNA wurde mit XbaI gespalten, und das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde

isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3 × 19-LL mit NcoI gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt. Nach der Spaltung mit XbaI wurde ein kleines Fragment, umfassend ein für den bivalenten F_v-Antikörper kodierendes Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgeleiteten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 8 gezeigt.

Beispiel 3

Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F^{II}-Antikörper-Konstruktes in Bakterien

E. coli-XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit den Expressionsplasmiden pDISC3 × 19-LL bzw. pDISC3 × 19-SL transformiert worden waren, wurden über Nacht in 2×YT-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 100 mM Glucose (2×YT_{GA}) bei 37°C gezüchtet. 1 : 50-Verdünnungen der Übernachtskulturen in 2×YT_{GA} wurden als Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM gezüchtet. Als die Kulturen einen OD₆₀₀-Wert von 0,8 erreicht hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2×YT-Mediums, das 50 µg/ml Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt, und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20–22°C) 18–20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an eiskalter 50 mM Tris-HCl, 20% Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1 stündigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäroplasten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Material als Pellet erhalten wurden. Der Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt, durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) geklärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingeeengt. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g, 4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chelatierender Sepharose (Pharmacia), die mit Cu²⁺ beladen war und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Startpuffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm des Effluentens minimal war, gewaschen (etwa dreißig Säulenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, eluiert.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Farbstoffbindungstest (1976, Anal. Biochem., 72, 248–254) unter Verwendung des Bio-Rad(München, Deutschland)-Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gereinigten tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden aus den A₂₈₀-Werten unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten ε^{1mg/ml} = 1,96 bzw. 1,93 bestimmt.

Beispiel 4

Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe *Pichia pastoris*

Kompetente *P. pastoris* GS155-Zellen (Invitrogen) wurden in Gegenwart von 10 pg Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit SacI linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die 100 pg/ml Zeocin™ enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Plattenscreening unter Verwendung eines anti-c-myc-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismaning, Deutschland) selektiert.

Zur Expression der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Rühren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

Beispiel 5

Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes

(A) Größenausschlußchromatographie

Eine analytische Gelfiltration der F_v-Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betrugen 200 µl/min bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

(B) Durchflußzytometrie

Die menschliche CD3⁺/CD19⁻-akute-T-Zell-Leukämie Jurkat und die CD19⁺/CD3⁻-B-Zelllinie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet. 5×10^5 Zellen in 50 µl RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100 µl der F_v-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100 µl 10 µg/ml anti-c-myc-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100 µl des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in 100 µl 1 µg/ml-Propidiumiodid-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

(C) Cytotoxizitätstest

Die CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zelllinie Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und

1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5% CO₂ inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat und 0,05 mM 2-ME supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard [⁵¹Cr]-Freisetzungstests bewertet; 2×10^6 Zielzellen wurden mit 200 µl Na [⁵¹Cr]O₄ (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von 2×10^5 /ml resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von 5×10^6 /ml eingestellt. Zunehmende Mengen an CTLs in 100 µl wurden auf 104 Zielzellen/Vertiefung in 50 µl titriert. 50 µl Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach ange-
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995
 1000
 1005
 1010
 1015
 1020
 1025
 1030
 1035
 1040
 1045
 1050
 1055
 1060
 1065
 1070
 1075
 1080
 1085
 1090
 1095
 1100
 1105
 1110
 1115
 1120
 1125
 1130
 1135
 1140
 1145
 1150
 1155
 1160
 1165
 1170
 1175
 1180
 1185
 1190
 1195
 1200
 1205
 1210
 1215
 1220
 1225
 1230
 1235
 1240
 1245
 1250
 1255
 1260
 1265
 1270
 1275
 1280
 1285
 1290
 1295
 1300
 1305
 1310
 1315
 1320
 1325
 1330
 1335
 1340
 1345
 1350
 1355
 1360
 1365
 1370
 1375
 1380
 1385
 1390
 1395
 1400
 1405
 1410
 1415
 1420
 1425
 1430
 1435
 1440
 1445
 1450
 1455
 1460
 1465
 1470
 1475
 1480
 1485
 1490
 1495
 1500
 1505
 1510
 1515
 1520
 1525
 1530
 1535
 1540
 1545
 1550
 1555
 1560
 1565
 1570
 1575
 1580
 1585
 1590
 1595
 1600
 1605
 1610
 1615
 1620
 1625
 1630
 1635
 1640
 1645
 1650
 1655
 1660
 1665
 1670
 1675
 1680
 1685
 1690
 1695
 1700
 1705
 1710
 1715
 1720
 1725
 1730
 1735
 1740
 1745
 1750
 1755
 1760
 1765
 1770
 1775
 1780
 1785
 1790
 1795
 1800
 1805
 1810
 1815
 1820
 1825
 1830
 1835
 1840
 1845
 1850
 1855
 1860
 1865
 1870
 1875
 1880
 1885
 1890
 1895
 1900
 1905
 1910
 1915
 1920
 1925
 1930
 1935
 1940
 1945
 1950
 1955
 1960
 1965
 1970
 1975
 1980
 1985
 1990
 1995
 2000
 2005
 2010
 2015
 2020
 2025
 2030
 2035
 2040
 2045
 2050
 2055
 2060
 2065
 2070
 2075
 2080
 2085
 2090
 2095
 2100
 2105
 2110
 2115
 2120
 2125
 2130
 2135
 2140
 2145
 2150
 2155
 2160
 2165
 2170
 2175
 2180
 2185
 2190
 2195
 2200
 2205
 2210
 2215
 2220
 2225
 2230
 2235
 2240
 2245
 2250
 2255
 2260
 2265
 2270
 2275
 2280
 2285
 2290
 2295
 2300
 2305
 2310
 2315
 2320
 2325
 2330
 2335
 2340
 2345
 2350
 2355
 2360
 2365
 2370
 2375
 2380
 2385
 2390
 2395
 2400
 2405
 2410
 2415
 2420
 2425
 2430
 2435
 2440
 2445
 2450
 2455
 2460
 2465
 2470
 2475
 2480
 2485
 2490
 2495
 2500
 2505
 2510
 2515
 2520
 2525
 2530
 2535
 2540
 2545
 2550
 2555
 2560
 2565
 2570
 2575
 2580
 2585
 2590
 2595
 2600
 2605
 2610
 2615
 2620
 2625
 2630
 2635
 2640
 2645
 2650
 2655
 2660
 2665
 2670
 2675
 2680
 2685
 2690
 2695
 2700
 2705
 2710
 2715
 2720
 2725
 2730
 2735
 2740
 2745
 2750
 2755
 2760
 2765
 2770
 2775
 2780
 2785
 2790
 2795
 2800
 2805
 2810
 2815
 2820
 2825
 2830
 2835
 2840
 2845
 2850
 2855
 2860
 2865
 2870
 2875
 2880
 2885
 2890
 2895
 2900
 2905
 2910
 2915
 2920
 2925
 2930
 2935
 2940
 2945
 2950
 2955
 2960
 2965
 2970
 2975
 2980
 2985
 2990
 2995
 3000
 3005
 3010
 3015
 3020
 3025
 3030
 3035
 3040
 3045
 3050
 3055
 3060
 3065
 3070
 3075
 3080
 3085
 3090
 3095
 3100
 3105
 3110
 3115
 3120
 3125
 3130
 3135
 3140
 3145
 3150
 3155
 3160
 3165
 3170
 3175
 3180
 3185
 3190
 3195
 3200
 3205
 3210
 3215
 3220
 3225
 3230
 3235
 3240
 3245
 3250
 3255
 3260
 3265
 3270
 3275
 3280
 3285
 3290
 3295
 3300
 3305
 3310
 3315
 3320
 3325
 3330
 3335
 3340
 3345
 3350
 3355
 3360
 3365
 3370
 3375
 3380
 3385
 3390
 3395
 3400
 3405
 3410
 3415
 3420
 3425
 3430
 3435
 3440
 3445
 3450
 3455
 3460
 3465
 3470
 3475
 3480
 3485
 3490
 3495
 3500
 3505
 3510
 3515
 3520
 3525
 3530
 3535
 3540
 3545
 3550
 3555
 3560
 3565
 3570
 3575
 3580
 3585
 3590
 3595
 3600
 3605
 3610
 3615
 3620
 3625
 3630
 3635
 3640
 3645
 3650
 3655
 3660
 3665
 3670
 3675
 3680
 3685
 3690
 3695
 3700
 3705
 3710
 3715
 3720
 3725
 3730
 3735
 3740
 3745
 3750
 3755
 3760
 3765
 3770
 3775
 3780
 3785
 3790
 3795
 3800
 3805
 3810
 3815
 3820
 3825
 3830
 3835
 3840
 3845
 3850
 3855
 3860
 3865
 3870
 3875
 3880
 3885
 3890
 3895
 3900
 3905
 3910
 3915
 3920
 3925
 3930
 3935
 3940
 3945
 3950
 3955
 3960
 3965
 3970
 3975
 3980
 3985
 3990
 3995
 4000
 4005
 4010
 4015
 4020
 4025
 4030
 4035
 4040
 4045
 4050
 4055
 4060
 4065
 4070
 4075
 4080
 4085
 4090
 4095
 4100
 4105
 4110
 4115
 4120
 4125
 4130
 4135
 4140
 4145
 4150
 4155
 4160
 4165
 4170
 4175
 4180
 4185
 4190
 4195
 4200
 4205
 4210
 4215
 4220
 4225
 4230
 4235
 4240
 4245
 4250
 4255
 4260
 4265
 4270
 4275
 4280
 4285
 4290
 4295
 4300
 4305
 4310
 4315
 4320
 4325
 4330
 4335
 4340
 4345
 4350
 4355
 4360
 4365
 4370
 4375
 4380
 4385
 4390
 4395
 4400
 4405
 4410
 4415
 4420
 4425
 4430
 4435
 4440
 4445
 4450
 4455
 4460
 4465
 4470
 4475
 4480
 4485
 4490
 4495
 4500
 4505
 4510
 4515
 4520
 4525
 4530
 4535
 4540
 4545
 4550
 4555
 4560
 4565
 4570
 4575
 4580
 4585
 4590
 4595
 4600
 4605
 4610
 4615
 4620
 4625
 4630
 4635
 4640
 4645
 4650
 4655
 4660
 4665
 4670
 4675
 4680
 4685
 4690
 4695
 4700
 4705
 4710
 4715
 4720
 4725
 4730
 4735
 4740
 4745
 4750
 4755
 4760
 4765
 4770
 4775
 4780
 4785
 4790
 4795
 4800
 4805
 4810
 4815
 4820
 4825
 4830
 4835
 4840
 4845
 4850
 4855
 4860
 4865
 4870
 4875
 4880
 4885
 4890
 4895
 4900
 4905
 4910
 4915
 4920
 4925
 4930
 4935
 4940
 4945
 4950
 4955
 4960
 4965
 4970
 4975
 4980
 4985
 4990
 4995
 5000
 5005
 5010
 5015
 5020
 5025
 5030
 5035
 5040
 5045
 5050
 5055
 5060
 5065
 5070
 5075
 5080
 5085
 5090
 5095
 5100
 5105
 5110
 5115
 5120
 5125
 5130
 5135
 5140
 5145
 5150
 5155
 5160
 5165
 5170
 5175
 5180
 5185
 5190
 5195
 5200
 5205
 5210
 5215
 5220
 5225
 5230
 5235
 5240
 5245
 5250
 5255
 5260
 5265
 5270
 5275
 5280
 5285
 5290
 5295
 5300
 5305
 5310
 5315
 5320
 5325
 5330
 5335
 5340
 5345
 5350
 5355
 5360
 5365
 5370
 5375
 5380
 5385
 5390
 5395
 5400
 5405
 5410
 5415
 5420
 5425
 5430
 5435
 5440
 5445
 5450
 5455
 5460
 5465
 5470
 5475
 5480
 5485
 5490
 5495
 5500
 5505
 5510
 5515
 5520
 5525
 5530
 5535
 5540
 5545
 5550
 5555
 5560
 5565
 5570
 5575
 5580
 5585
 5590
 5595
 5600
 5605
 5610
 5615
 5620
 5625
 5630
 5635
 5640
 5645
 5650
 5655
 5660
 5665
 5670
 5675
 5680
 5685
 5690
 5695
 5700
 5705
 5710
 5715
 5720
 5725
 5730
 5735
 5740
 5745
 5750
 5755
 5760
 5765
 5770
 5775
 5780
 5785
 5790
 5795
 5800
 5805
 5810
 5815
 5820
 5825
 5830
 5835
 5840
 5845
 5850
 5855
 5860
 5865
 5870
 5875
 5880
 5885
 5890
 5895
 5900
 5905
 5910
 5915
 5920
 5925
 5930
 5935
 5940
 5945
 5950
 5955
 5960
 5965
 5970
 5975
 5980

14. Expressionsplasmid, kodierend für das multivalente F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–12.
15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3 × 19-LL. 5
16. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3 × 19-SL.
17. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-LL.
18. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-SL. 10
19. Verwendung des multivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1–12 zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen.
20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die Erkrankungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen sind. 15

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

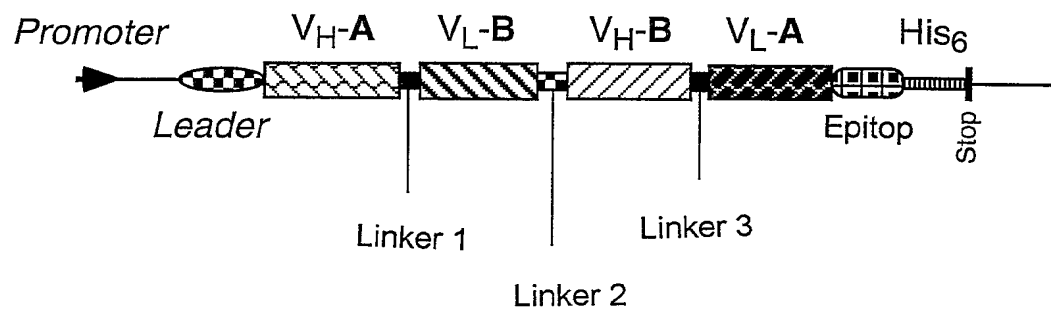
50

55

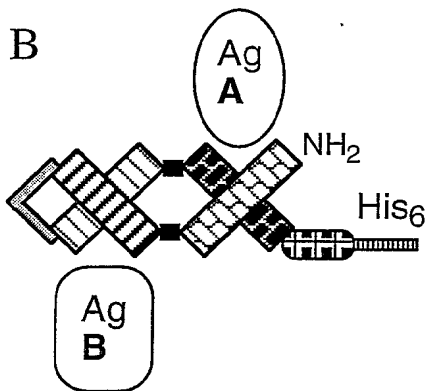
60

65

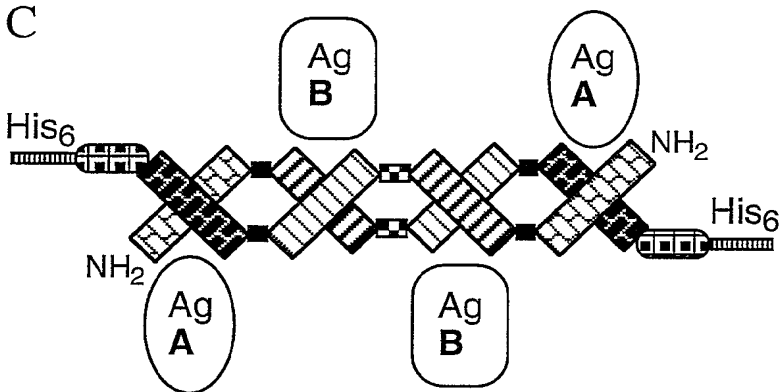
A



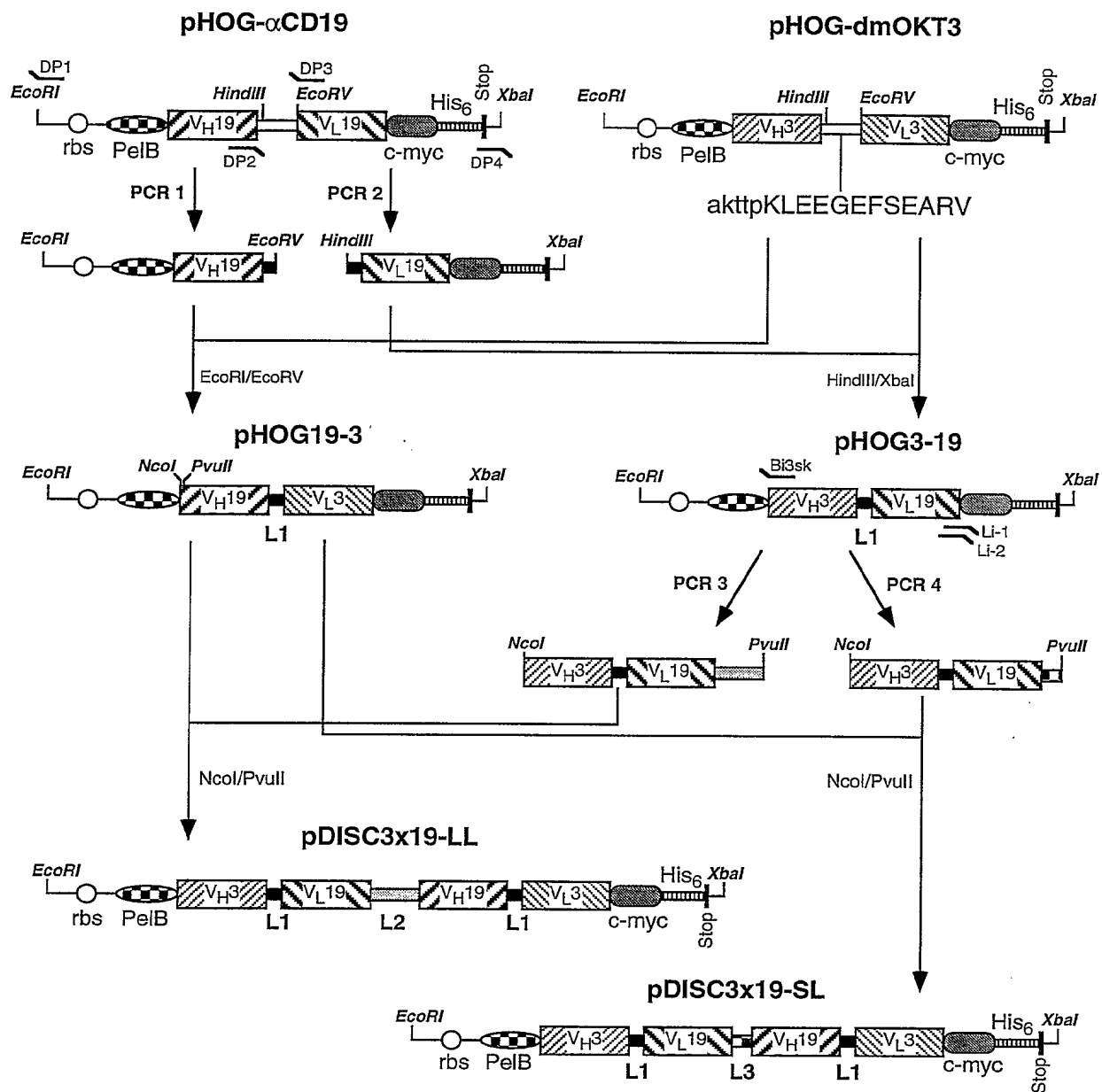
B



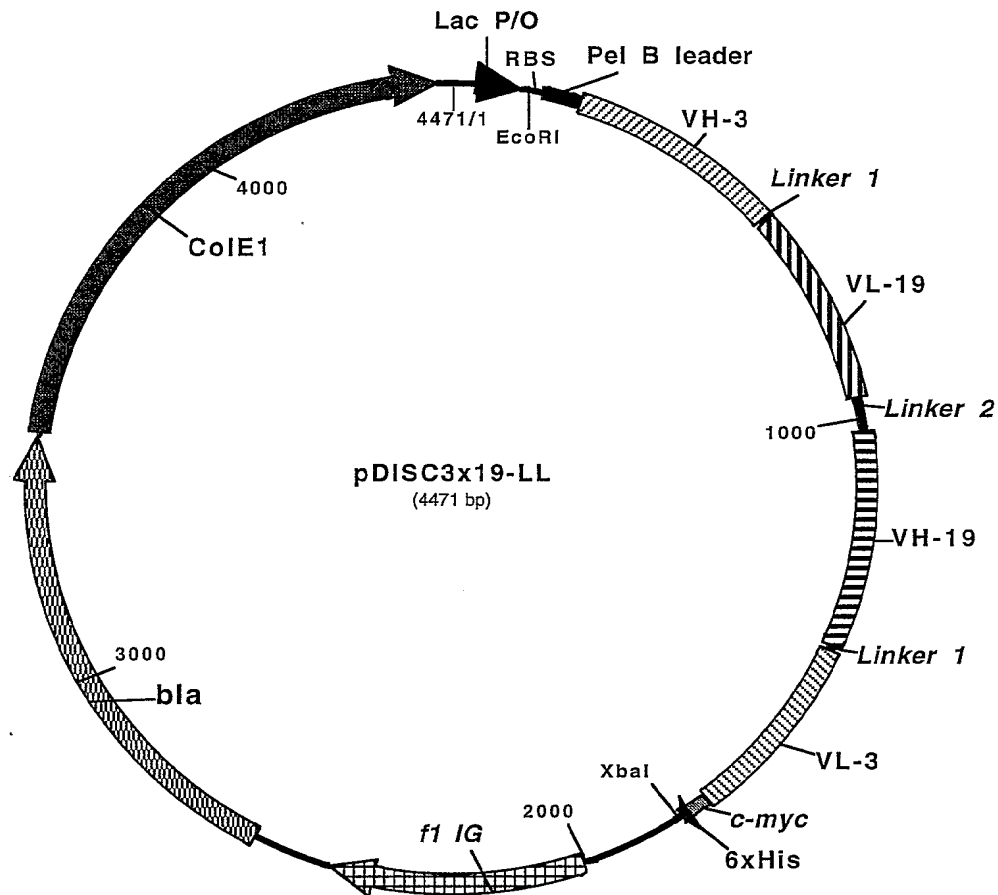
C



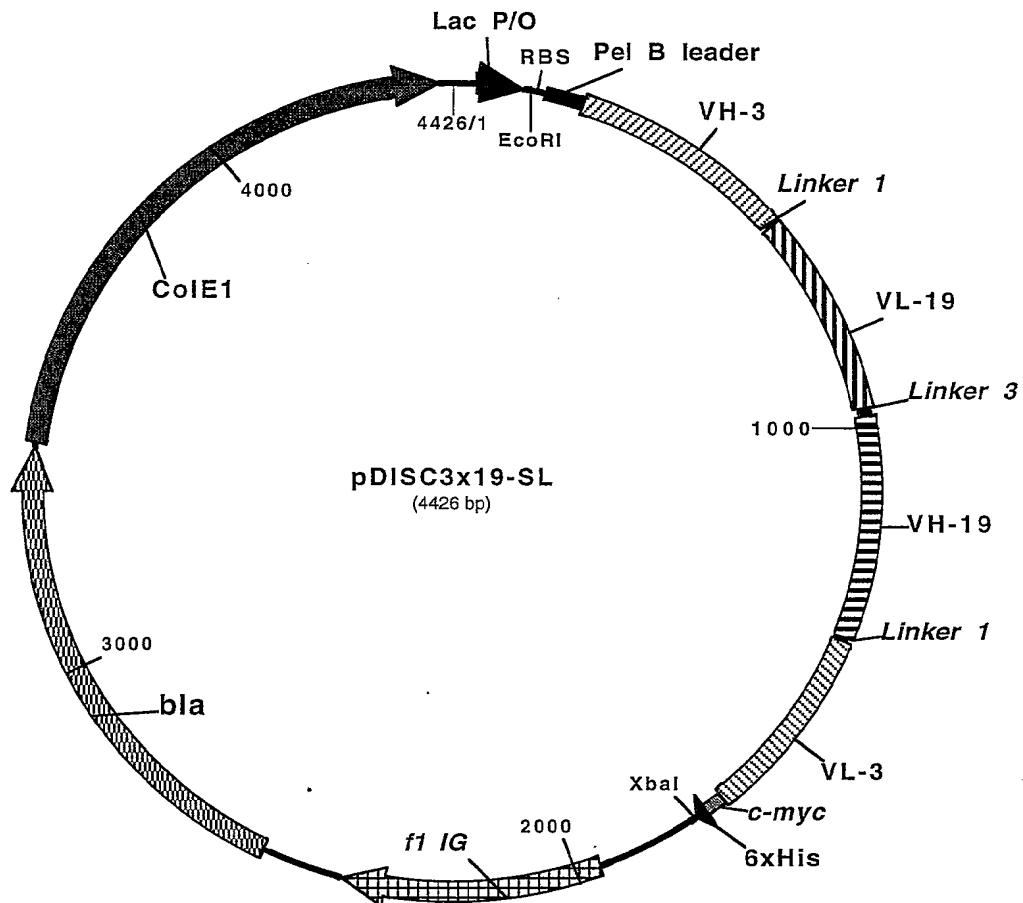
FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3



FIGUR 4

EcoRI RBS PelB leader NcoI
 1 GAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGG
 1 M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M
 * Frame-H1 VH anti-CD3
 92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC
 22 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T
 CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2
 183 TAGGTACACGATGCACCTGGGTAAACAGAGGCCTGGACAGGGCTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTTGGTTATAC
 52 R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T
 Frame-H3
 267 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGAC
 80 N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T
 CDR-H3 Frame-H4
 354 ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA
 109 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L
 CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19
 440 CAGTCTCCTCAGCCAAACACACCAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGA
 138 T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q
 CDR-L1 Frame-L2
 530 GGGCCACCATCTCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAAGCTGGTACCAACAGATTCCAGGAC
 168 R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G
 CDR-L2 Frame-L3
 614 AGCCACCCAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCCAAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT
 196 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F
 CDR-L3 Frame-L4
 702 CACCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTGAGCAAAGTACTGAGGATCCGTGGACGTTCCGTGGA
 225 T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G
 C kappa NotI Linker 2
 790 GGCACCAAGCTGGAATCAAAACGGGCTGATGCTCGGGCCGCTGGTGGTGGTGGTCTGGCGGGGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGG
 255 G T K L E I K R A D A A A A G G G G S G G G G S G G G G
 PvuII Frame-H1 VH anti-CD19
 874 TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCTGGGTCTCCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGG
 283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K
 CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2
 962 CTTCTGGCTATGCATTCACTAGCTACTGGATGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTGGCC
 312 A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W
 PstI Frame-H3
 1049 CTGGAGATGGTGATACTAATACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGACGAATCTCCAGCACAGCCTACA
 341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y
 CDR-H3
 1133 TGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGGCCGTTATTACTAT
 369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y
 Frame-H4 CH1 Linker 1 Frame-L1
 1219 GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAACACACCAAGCTTGGCGGTGATATCGTGTCACTC
 398 A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T
 VL anti-CD3 CDR-L1
 1307 AGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAATCGG
 427 Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M N W
 Frame-L2 CDR-L2 Frame-L3
 1393 TACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCA
 456 Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G
 CDR-L3
 1481 GTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAA
 485 S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N
 Frame-L4 C kappa c-myc epitope
 1569 CCCATTACAGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGCTGATCTGCACCAACTGGATCCGAACAAAGCTGATCTCAG
 514 P F T F G S G T K L E I N R A D T A P T G S E Q K L I S
 His6 tail XbaI
 1655 AAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAATCTAGA
 543 E E D L N S H H H H H H .

FIGUR 5

EcoRI RBS PelB leader NcoI

1 GAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCTTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGCGCATGG

1 M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M

Frame-H1 VH anti-CD3

92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC

22 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T

CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2

183 TAGGTACACGATGCACCTGGGTAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAAATCCTAGCCGTGGTTATAC

52 R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T

Frame-H3

267 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGAC

80 N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T

CDR-H3 Frame-H4

354 ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA

109 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L

CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19

440 CAGTCTCTCTCAGCCAAAACACCCAAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCACAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGCAGA

138 T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q

CDR-L1 Frame-L2

530 GGGCCACCATCTCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGAC

168 R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G

CDR-L2 Frame-L3

614 AGCCACCCAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCCAAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT

196 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F

CDR-L3 Frame-L4

702 CACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTGAGCAAAGTACTGAGGATCCGTGGACGTTCCGTGGA

225 T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G

C kappa NotI Linker 3 PvuII Frame-H1

790 GGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCGGCCGCTGGTGGCCAGGGTTCGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCT

255 G T K L E I K R A D A A A A G G P G S Q V Q L Q Q S G A E L

VH anti-CD19 CDR-H1 Frame-H2

879 GGTGAGGCCCTGGGCTCCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAAGTGGTGAAGCAGAGCC

284 V R P G S S V K I S C K A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R

CDR-H2

968 CTGGACAGGCTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGCCCTGGAGATGGTGATACTAATACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCC

314 P G Q G L E W I G Q I W P G D G D T N Y N G K F K G K A

Frame-H3

1051 ACTCTGACTGCAGACGAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAC

342 T L T A D E S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R

CDR-H3 Frame-H4 CH1

1142 GGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCAACGCTCTCTCAGCCAAAA

372 R E T T T V G R Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S A K

Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD3

1226 CAACACCCAAAGCTTGGCGGTGATATCGTCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGCTGCATCTCCAGGGGAGAAGTCAACATGACCTGCA

400 T T P K L G G D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C

CDR-L1 Frame-L2 CDR-L2

1316 GTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGAAGTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTATGACACATCCAA

430 S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K

Frame-L3

1401 ACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGC

458 L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A

CDR-L3 Frame-L4 C kappa

1491 TGCCACTTATTACTGCGCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTTCACGTTGCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGCTGATACGCTG

488 A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K L E I N R A D T A

c-myc epitope His6 tail XbaI

1578 ACCAACTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAATCTAGA

517 P T G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H H .

FIGUR 6

941 **ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC**
1► M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATG
25► T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT
50► V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI

EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTC**CAGGTGCAACTGCAGCAGTC**
75► A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S

VH anti-CD3

1234 **TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT**
98► G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 7

941 **ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC**
1► M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 **AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATG**
25► T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

BsrDI

1089 **TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTTATAAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT**
50► V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI**EcoRI**

1163 **GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCATGGCGCAGGTGCAACTGCAG**
75► A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q

VH anti-CD3

1235 **CAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT**
99► Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 8